

**BEST AVAILABLE COPY**

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/KR05/001792

International filing date: 13 June 2005 (13.06.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2004-0088245  
Filing date: 02 November 2004 (02.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office

출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0088245 호  
Application Number 10-2004-0088245

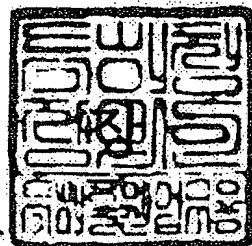
출 원 일 자 : 2004년 11월 02일  
Date of Application NOV 02, 2004

출 원 인 : 주식회사 디지털바이오테크놀로지  
Applicant(s) Digital Bio Technology Co., Ltd.

2005 년 06 월 17 일

특 허 청

COMMISSIONER



**【서지사항】**

**【서류명】** 특허출원서  
**【권리구분】** 특허  
**【수신처】** 특허청장  
**【제출일자】** 2004. 11. 02  
**【발명의 국문명칭】** 중공형의 관을 포함하는 전기천공 장치  
**【발명의 영문명칭】** An Electroporation Device Comprising a Tube or a Capillary

**【출원인】**

**【명칭】** 주식회사 디지털바이오테크놀로지

**【출원인코드】** 1-2000-049798-4

**【대리인】**

**【성명】** 김영철

**【대리인코드】** 9-1998-000040-3

**【포괄위임등록번호】** 2003-030658-4

**【대리인】**

**【성명】** 김순영

**【대리인코드】** 9-1998-000131-1

**【포괄위임등록번호】** 2003-030659-1

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 조근창

**【성명의 영문표기】** CH0, Keunchang

**【주민등록번호】** 680715-1075619

**【우편번호】** 151-055

**【주소】** 서울특별시 관악구 봉천5동 관악드림타운 APT 109동 501호

**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 김정아

**【성명의 영문표기】** KIM, Jeong Ah  
**【주민등록번호】** 790810-2466332  
**【우편번호】** 440-320  
**【주소】** 경기도 수원시 장안구 율전동 536-13  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 정찬일  
**【성명의 영문표기】** CHUNG, Chanil  
**【주민등록번호】** 691224-1066914  
**【우편번호】** 437-080  
**【주소】** 경기도 의왕시 내손동 삼성래미안 106동 2201호  
**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 장준근  
**【성명의 영문표기】** CHANG, Jun Keun  
**【주민등록번호】** 670916-1047621  
**【우편번호】** 137-064  
**【주소】** 서울특별시 서초구 방배4동 그랑시엘 빌라 501호  
**【국적】** KR

**【심사청구】** 청구

**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 김영철 (인) 대리인  
 김순영 (인)

**【수수료】**

**【기본출원료】** 0 면 38,000 원  
**【가산출원료】** 33 면 0 원

<b>【우선권주장료】</b>	0    건	0    원
<b>【심사청구료】</b>	15    항	589,000   원
<b>【합계】</b>	627,000   원	
<b>【감면사유】</b>	소기업(70%감면)	
<b>【감면후 수수료】</b>	188,100   원	
<b>【첨부서류】</b>	1. 소기업임을 증명하는 서류_1통	

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 장치에 관한 것이다. 본 발명에 따른 전기천공 장치는, 모세관 또는 튜빙과 같은 중공형의 관; 및 상기 관의 후단에 연결되며, 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전할 수 있도록 적정 압력을 유지할 수 있는 압력 유지 수단을 포함한다. 상기 관의 양단에 전기 펄스를 인가함으로써 상기 관 내부에 충전되어 있는 시료 중의 세포를 전기천공할 수 있다.

본 발명에 따른 전기천공 장치를 이용함으로써 세포를 높은 효율로 용이하게 전기천공할 수 있다. 또한, 세포가 모세관 또는 튜빙과 같은 관 내에서 전기천공되므로, 전기천공된 세포를 용이하게 효과적으로 회수하여 사용할 수 있다.

### 【대표도】

#### 도 4

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

중공형의 관을 포함하는 전기천공 장치 {An Electroporation Device  
Comprising a Tube or a Capillary}

### 【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1a 및 도 1b는 각각 종래의 전기천공 장치에 사용되는, 평행판 알루미늄 전극이 구비된 큐벳을 촬영한 사진 및 그의 모식도.
- <2> 도 2는 종래의 전기천공 장치인 스퀘어 웨이브 전기천공 장치(ECM 830, BTX, 미국).
- <3> 도 3은 본 발명의 전기천공 장치에 따른 제1실시예의 구성도.
- <4> 도 4는 본 발명의 전기천공 장치에 따른 제2실시예의 구성도.
- <5> 도 5는 본 발명의 전기천공 장치에서 디스크 형태의 커넥터와 모세관의 연결 형태를 도시한 것.
- <6> 도 6은 상기 디스크 형태의 커넥터의 단면도.
- <7> 도 7은 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제1실시예.
- <8> 도 8은 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제2실시예.
- <9> 도 9는 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제3실시예.
- <10> 도 10은 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제4실시예.
- <11> 도 11은 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제5실시예.

12> 도 12a 및 도 12b는 본 발명에 따른 전기천공 장치에 의하여 전기천공된 세포의 현미경 사진으로서, 동일 영역의 세포를 명시야(bright field)로 관찰한 사진(a) 및 형광으로 관찰한 사진(b).

13> 도 13a 및 도 13b는 종래의 전기천공 장치에 의하여 전기천공된 세포의 현미경 사진으로서, 동일한 영역의 세포를 명시야(bright field)로 관찰한 사진(a) 및 형광으로 관찰한 사진(b).

14> <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

15> 100 : 전기 펄스 발생기 200a, 200b : 전극

16> 300, 300a, 300b : 리저버 400 : 중공형의 관

17> 500 : 커넥터 600, 610 : 압력 유지 수단

### **【발명의 상세한 설명】**

### **【발명의 목적】**

### **【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

18> 본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 장치에 관한 것이다. 본 발명에 따른 전기천공 장치는, 모세관 또는 튜빙과 같은 중공형의 관; 및 상기 관의 후단에 연결되며, 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전할 수 있도록 적정 압력을 유지할 수 있는 압력 유지 수단을 포함한다. 상기 관의 양단에 전기 펄스를 인가함으로써 상기 관 내부에 충전되어 있는 시료 중의 세포를 전기천공할 수 있다.



- 19> 전기천공법(electroporation)이란, 세포막을 투과하지 못하는 거대분자(macromolecule)를 전기 펄스에 의하여 세포 내로 주입하는 기술이다. 상기 전기천공법은 세포 실험 및 유전자 치료에 직접적으로 적용될 수 있는, 매우 강력하고, 널리 사용되는 방법이다. 높은 전기장이 인가되는 경우, 세포막이 일시적으로 다공성화되고, 외부 물질에 대하여 투과성을 나타낸다. 이러한 전기적 투과성화(electropermeabilization)는 여러 가지 요인(예를 들어, 펄스 폭, 펄스 지속시간, 펄스 수, 및 다른 실험 조건 등)에 의존한다.
- 20> 세포 현탁액 및 유전자의 혼합물에 전기장을 인가하기 위하여, 도 1a 및 도 1b에 도시되어 있는 바와 같이 두 개의 평행한 전극(200a, 200b)이 구비된 큐벳이 통상적으로 사용된다. 상기 두 개의 전극 사이에 높은 전기장을 인가하는 경우, 유전자를 세포 내로 주입할 수 있다.
- 21> 도 2는 종래 전기천공 장치의 예로서, 스퀘어 웨이브 전기천공 장치(ECM 830, BTX, 미국)를 도시한 것이다.
- 22> 이러한 종래의 전기천공 장치는 다음과 같은 문제점이 있다.
- 23> 첫째, 큐벳이 지나치게 고가이다. 이는 큐벳 내 마주보는 두 면에 전극이 장착되어 있기 때문이다. 따라서, 전기천공 장치 제조사들은 큐벳을 일회용으로 사용할 것을 권장하지만, 많은 사용자들은 수회 반복하여 실험하기 때문에, 실험 오차가 발생할 가능성이 높다.

- 24> 둘째, 전극 물질(Al)이 용액 내에서 반응성이 높고, 수소 생성에 대한 과전압(overpotential)이 낮기 때문에, 전기 펄스에 대하여 반응하거나, 전극 표면에서 물분해에 의한 기포가 발생된다.
- 25> 셋째, 생성된 이온( $Al^{3+}$ )은 세포에 악영향을 미친다.
- 26> 넷째, 산화막( $Al_2O_3$ )으로 인하여 표면 저항이 크게 증가한다.
- 27> 다섯째, 전기장이 균일하지 않다. 대부분의 전류가 전극의 모서리 부분을 통하여 흐르기 때문에 전기장이 왜곡된다.
- 28> 여섯째, 시료의 부피가 크다. 따라서, 단일 세포 분석에 적합하지 않다.
- 29> 이러한 문제점들을 해결하기 위하여, 미세채널을 구비하는 전기천공 장치가 제안되었다. 이러한 전기천공 장치는 세포를 포함하는 시료를 미세채널 내에 충전시킨 후, 채널 양단에 전기 펄스를 인가하여 세포를 전기천공하는 장치이다. 그러나, 미세채널 내부에 존재하는 전기천공된 세포를 회수하는 것이 곤란하다는 문제가 있다. 따라서, 이러한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 전기천공 장치의 개발이 필요하다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 30> 본 발명은 상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명에 따른 전기천공 장치는 모세관 또는 튜빙과 같은 중공형의 관; 및 상기 관의 후단에 연결되며, 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전할 수 있도록 적정 압력을 유지할 수 있는 압력 유지 수단을 포함한다. 상기 관의 양단에 전기 펄스를 인가함

으로써 상기 관 내부에 충전되어 있는 시료 중의 세포를 전기천공할 수 있다.

31> 본 발명에 따른 전기천공 장치를 이용함으로써 전기천공을 용이하게 수행할 수 있다. 또한, 세포가 모세관 또는 튜빙과 같은 관 내에서 전기천공되므로, 전기천공된 세포를 용이하게 효과적으로 회수하여 사용할 수 있다.

32> 따라서, 본 발명의 목적은 전기천공 장치를 제공하는 것이다.

33> 또한, 본 발명의 목적은 상기 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템을 제공하는 것이다.

34> 또한, 본 발명의 목적은 전기천공 방법을 제공하는 것이다.

#### 【발명의 구성】

35> 본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 장치에 관한 것으로서,

36> 전기 펄스를 생성하는 펄스 발생기; 상기 시료를 저장하는 1쌍의 리저버; 및 상기 시료로 내부가 충전되어 있는 관을 포함하며,

37> 상기 1쌍의 리저버는 상기 관에 의하여 서로 연결되고, 상기 1쌍의 리저버에 상기 펄스 발생기의 전극을 삽입하고, 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공할 수 있는 장치에 관한 것이다.

38> 또한, 본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 장치로서, 중공형의 관; 및 상기 관의 후단에 연결되며, 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전할 수

있도록 적정 압력을 유지할 수 있는 압력 유지 수단을 포함하는 전기천공 장치에 관한 것이다.

39> 상기 전기천공 장치에 있어서, 상기 관의 후단과 상기 압력 유지 수단은 커넥터(예를 들어, T자형 커넥터 또는 Y자형 커넥터)에 의하여 연결되며, 상기 커넥터에는 전극을 삽입할 수 있는 전극삽입부가 형성되어 있다. 상기 전극삽입부에는 전기 펄스를 인가하기 위한 전극이 삽입되어 있다. 상기 전극은, 상기 관의 내부가 시료로 충전되어 있는 경우 상기 시료와 접촉하게 된다.

40> 전기천공하고자 하는 세포를 포함하는 시료를 리저버에 주입하고, 상기 전기천공 장치의 상기 관의 전단을 상기 리저버의 시료에 담근 상태에서 상기 압력 유지 수단을 사용하여, 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전한다. 이후, 상기 리저버에 저장되어 있는 시료와 접촉하고 있는 전극과 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공할 수 있다.

41> 또한, 본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 시스템에 관한 것이다.

42> 본 발명에 따른 전기천공 시스템은 상기 전기천공 장치; 전기 펄스를 생성하는 펄스 발생기; 및 상기 시료를 저장하는 리저버를 포함한다.

43> 본 발명에 따른 전기천공 시스템에서, 상기 리저버에는 또다른 전극이 삽입되어 상기 시료와 접촉되어 있고, 상기 리저버에 저장되어 있는 시료에 상기 전기

천공 장치의 판의 전단이 잠겨 있는 상태에서 상기 압력 유지 수단에 의하여 상기 판의 내부가 상기 시료로 충전된다. 상기 리저버에 저장되어 있는 시료와 접촉하고 있는 전극과 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 판 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공할 수 있다.

14> 또한, 본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 방법에 관한 것이다.

15> 본 발명에 따른 전기천공 방법은,

16> 세포를 포함하는 시료를 리저버에 저장하는 단계;

17> 상기 전기천공 장치에서 상기 판의 전단을 상기 리저버에 저장되어 있는 시료에 담그는 단계;

18> 상기 판의 전단이 상기 리저버에 저장되어 있는 시료에 잠겨있는 상태에서 상기 압력 유지 수단을 이용하여 상기 판의 내부를 상기 시료로 충전하는 단계;

19> 상기 리저버에 또다른 전극을 삽입하여 상기 시료와 접촉시키는 단계;

50> 상기 전기천공 장치 중 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극과 상기 리저버에 삽입되어 있는 전극 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 판 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공하는 단계; 및

51> 상기 판 내부에 충전되어 있는 시료를 상기 압력 유지 수단을 이용하여 다른 리저버로 이송하여 회수하는 단계를 포함한다.

- 52> 경우에 따라서는(예를 들어, 시료의 양이 매우 적은 경우 등), 전극을 삽입하여 상기 시료와 접촉시키기 전에, 상기 시료가 들어있는 리저버를 전해용액만이 들어 있는 리저버로 교체하여 대신 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우, 상기 관의 전단은 전해용액이 들어있는 리저버에 잠기게 되며, 전극이 상기 리저버의 전해용액과 접촉하게 된다.
- 53> 본 발명에 따른 전기천공 장치, 전기천공 시스템 또는 전기천공 방법에 있어서, 상기 전극으로는 전기적으로 도전성인 임의의 전극을 사용할 수 있으며, 백금 전극 또는 금전극을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 압력 유지 수단으로는 펌프, 시린지 또는 피펫을 사용하는 것이 바람직하다.
- 54> 또한, 사용되는 중공형의 관으로는 모세관 또는 튜빙을 사용하는 것이 바람직하다. 특히, 관 내에 전기장이 균일하게 분포되도록 직경이 10um 내지 1cm의 관을 사용하는 것이 바람직하다.
- 55> 이하에서는 도면을 참조하여 본 발명에 따른 전기천공 장치, 전기천공 시스템 및 전기천공 방법의 실시예를 구체적으로 설명한다. 그러나, 본 발명이 하기 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다. 설명의 편의를 위하여, 본 발명에 있어서 동일한 기능을 수행하는 구성요소에 대해서는 동일한 부호를 부여하였다. 또한, 설명의 중복을 피하기 위하여, 동일한 구성요소에 대해서는 동일한 설명을 반복하여 기재하지 아니하였다.

56> 도 3은 본 발명의 전기천공 장치에 따른 제1실시예의 구성도이다. 상기 전기천공 장치는 전기 펄스를 생성하는 펄스 발생기(100); 상기 시료를 저장하는 1쌍의 리저버(300a, 300b); 및 상기 시료로 내부가 충전되어 있는 관, 예를 들어, 모세관 또는 튜빙(400)을 포함한다.

57> 상기 1쌍의 리저버(300a, 300b)는 상기 관(400)에 의하여 서로 연결된다. 상기 1쌍의 리저버(300a, 300b)에는 상기 펄스 발생기와 전기적으로 접촉하기 위한 전극(200a, 200b)이 각각 삽입되어 있다. 상기 전극(200a, 200b)에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관(400) 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공한다.

58> 도 4는 본 발명의 전기천공 장치에 따른 제2실시예의 구성도이다.

59> 상기 전기천공 장치는 모세관 또는 튜빙과 같은 중공형의 관(400); 및 상기 관(400)의 후단에 연결되며, 상기 관(400)의 내부를 상기 시료로 충전할 수 있도록 적정 압력을 유지할 수 있는 압력 유지 수단으로서 시린지(600)를 포함한다.

50> 상기 전기천공 장치에서, 상기 관(400)의 후단과 상기 압력 유지 수단(600)은 T자형 커넥터(500)에 의하여 연결된다. 상기 커넥터(500)에는 전극을 삽입할 수 있는 전극삽입부(520)가 형성되어 있고, 전기 펄스를 인가하기 위한 전극(200b)이 상기 전극삽입부(520)에 삽입되어 있다. 상기 관(400)의 내부가 시료로 충전되어 있는 경우, 상기 전극(200b)은 상기 시료와 접촉하게 된다.

51> 상기 관(400)의 후단과 상기 커넥터(500) 사이, 및 상기 커넥터(500)와 상기 압력 유지 수단(600) 사이는 어댑터(550)를 사용하여 연결시킨다.

- 52> 도 5는 본 발명에 따른 전기천공 장치에서 디스크 형태의 커넥터(500)를 사용하는 경우, 상기 디스크 형태의 커넥터(500)와 관(400)이 연결되어 있는 형태를 도시한 것이다. 도 6은 상기 디스크 형태의 커넥터(500)의 단면도이다.
- 53> 상기 디스크 형태의 커넥터(500)는 시료를 통과시키기 위한 홀(510)이 내측에 형성되어 있다. 전극삽입부(520)는 디스크 측면에 형성되어 있다. 도 6에 도시되어 있는 바와 같이, 상기 전극삽입부에는 전극(200b)이 L자 형태로 삽입되어 있어서, 상기 관(400)의 내부가 시료로 충전되어 있는 경우 상기 전극(200b)이 상기 시료와 접촉하게 된다.
- 54> 도 7은 상기 전기천공 장치를 펄스 발생기에 연결하여 세포를 전기천공하는 전기천공 시스템의 제1실시예를 도시한 것이다.
- 55> 상기 전기천공 시스템은 전술한 바와 같은 전기천공 장치; 전기 펄스를 생성하는 펄스 발생기(100); 및 상기 시료를 저장하는 리저버(300)를 포함한다.
- 56> 세포를 포함하는 시료가 상기 리저버(300)에 저장되어 있으며, 상기 리저버(300)에는 또다른 전극(200a)이 삽입되어 상기 시료와 접촉한다. 또한, 상기 시료에는 상기 관(400)의 전단이 잠겨있다. 이러한 상태에서, 펌프(610)에 의하여 작동되는 시린지(600)를 압력 유지 수단으로서 사용하여, 상기 관(400)의 내부를 상기 시료로 충전시킨다.
- 57> 이 때, 상기 관(400)의 내부를 상기 시료로 충전한 이후에, 상기 시료가 들어있는 리저버를 전해용액이 들어있는 리저버로 교체하여 사용할 수도 있다.



58>           상기 리저버(300)에 저장되어 있는 시료 또는 전해용액과 접촉하고 있는 전극(200a)과 상기 커넥터(500)에 삽입되어 있는 전극(200b) 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관(400) 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공할 수 있다.

59>           도 8은 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제2실시예로서, 압력 유지 수단으로서 펌프(600)를 사용한다. 따라서, 관(400)이 상기 커넥터(500)를 통하여 상기 펌프(600)에 연결된다.

70>           도 9는 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제3실시예로서, 압력 유지 수단으로서 피펫(600)을 사용한다. 따라서, 관(400)이 상기 커넥터(500)를 통하여 상기 피펫(600)에 연결된다.

71>           도 10은 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제4실시예로서, 리저버를 사용하지 아니하고, 전극(200a)을 관(400)의 전단에 삽입한다. 따라서, 상기 관(400)의 양단에 위치하는 전극(200a, 200b)을 통하여 펄스 발생기(100)의 전기 펄스를 인가할 수 있다.

72>           도 11은 전기천공 장치를 포함하는 전기천공 시스템의 제5실시예로서, 상기 전기천공 장치가 복수개 구비되어 있으며, 서로 병렬로 배치되어 있다.

73>           이하에서는 도면을 참조하여, 본 발명에 따른 전기천공 장치를 이용한 전기천공 실험에 대하여 설명한다.

74> 본 발명에 따른 전기천공 장치의 효과를 확인하기 위하여, HEK-293 세포주 내에 플라스미드 DNA pEGFP를 주입하는 실험을 수행하였다.

75> **1. 세포 준비**

76> 상기 HEK-293 세포주를  $25\text{cm}^2$  배양 플라스크 내에서 10% FBS로 보충한 배지 내에 보관하고,  $\text{CO}_2$  인큐베이터 내에서 배양하여, 70% 분포(confluency)까지 배양하였다. 이후, 배지를 제거하고, PBS 완충액을 사용하여 세포를 세척하고, 트립신 처리하였다(trypsinize). 이후, FBS로 보충된 배지를 가하고, 원심분리하였다. 이후, PBS 완충액으로 세포를 세척하고, 10% FBS로 보충된 배지내에서 재현탁시켜, 세포 시료를 준비하였다.

77> **2. 전기천공**

78> 상기한 바와 같이 준비한 HEK-293 세포 시료를 실온에서 약  $100\mu\text{l}$ 를 리저버에 주입하였다. 상기 시료  $100\mu\text{l}$ 에 감염 물질로서 플라스미드 DNA pEGFP  $3\mu\text{g}$ 을 넣고 혼합하였다. 이후, 본 발명에 따른 전기천공 장치의 관의 전단을 상기 리저버 내의 혼합액에 담그었다. 상기 관의 전단이 상기 리저버에 저장되어 있는 시료에 잠겨있는 상태에서 압력 유지 수단을 이용하여 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전하였다.

79> 이후, 상기 리저버를 전해용액만이 들어 있는 리저버로 교체하고, 상기 전해용액만이 들어 있는 리저버에 또다른 전극을 삽입한 후, 상기 관의 전단을 상기 리

저버에 잠기게 하였다. 이후, 펄스 전압, 펄스 지속시간 및 펄스 반복 횟수 등의 전기장 인가 조건을 설정하였다. 본 실험에서는 0.64kV/cm의 전기장을 40ms 펄스 지속시간으로 1회 인가하는 것으로 설정하였다. 이후, 상기 전기천공 장치 중 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극과 상기 전해용액만이 들어 있는 리저버에 삽입되어 있는 전극 사이에 상기 전기장 인가 조건 하에서 전기 펄스를 인가하였다.

### 30> 3. 전기천공된 세포의 회수

31> 이후, 상기 압력 유지 수단을 사용하여, 상기 관 내의 시료를 배양 플레이트로 옮기고, 배지를 가하였다. 이후, CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 상기 수득한 세포를 배양하였다. 이후, 세포를 계수하고, 감염률을 측정하였다.

### 32> 4. 실험 결과

33> 도 12a 및 도 12b는 본 발명에 따른 전기천공 장치에 의하여 플라스미드 DNA pEGFP가 삽입된 HEK-293 세포주를 현미경으로 촬영한 사진이다. 도 12a는 명시야로 관찰한 사진이고, 도 12b는 형광으로 관찰한 사진이다. 실험 결과, 감염률은 약 65 내지 70%이며, 세포의 생존률은 약 93%인 것으로 나타났다.

34> 도 13a 및 도 13b는 도 1에 도시되어 있는 바와 같은 종래의 전기천공 장치를 사용하여 동일한 조건으로 실험한 결과로서, 플라스미드 DNA pEGFP가 삽입된 HEK-293 세포주를 현미경으로 촬영한 사진이다. 도 13a는 명시야로 관찰한 사진이

고, 도 13b는 형광으로 관찰한 사진이다. 실험 결과, 감염률은 약 50%이고, 세포의 생존률은 약 82%인 것으로 나타났다.

35> 종래 기술에서 흔히 볼 수 있었던, 사멸하거나 잘 자리지 않은 세포들(도 13a에서 둥근 모양의 세포)이 본 발명에 의한 결과(도 12a 및 도 12b)에서는 현저히 감소하였음을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 전기천공 장치를 사용하는 경우, 감염률 및 생존률이 보다 더 우수함을 알 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 전기천공 장치를 사용하는 경우, 전기천공에 의하여 특정 물질이 주입된 세포를 용이하게 회수할 수 있다.

#### 【발명의 효과】

36> 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 전기천공 장치를 이용함으로써 세포를 용이하게 전기천공할 수 있다. 또한, 세포가 모세관 또는 튜빙과 같은 관 내에서 전기천공되므로, 전기천공된 세포를 용이하게 효과적으로 회수하여 사용할 수 있다.

37> 특히, 직경이 작은 모세관 또는 튜빙을 사용하는 경우, 전류는 좁은 관을 통해서만 흐르기 때문에 관 내에 전기장이 균일하게 분포된다. 따라서, 실험 조건의 오차를 줄일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 전기천공 장치에서 전극 및 관은 분리 및 탈착 가능하므로, 성능이 우수한 백금 전극 등을 영구적으로 사용할 수 있고, 관은 1회용으로 간편하게 사용할 수 있다. 성능이 우수한 전극을 사용하므로, 물의 분해에 의한 수소 발생 또는 금속 이온 형성 등을 억제할 수 있다.

38> 또한, 리저버에 저장된 시료의 일부를 관에 충전시킨 후, 전기천공하여 회수

할 수 있기 때문에 시료의 손실이 거의 없으며, 소량의 시료만으로도 실험이 가능하다. 또한, 표면적 대 부피비가 작은 모세관 등을 사용하기 때문에 열 방출이 빨라 세포가 열에 의한 스트레스를 받지 않는다. 또한, 압력 유지 수단을 적절히 제어함으로써, 대용량의 시료를 자동화하여 실험할 수 있고, 복수개의 전기천공 장치를 사용하여 병렬적으로 처리함으로써, 최적의 실험 조건을 용이하게 조성하고, 여러 개의 시료를 동시에 처리할 수 있다.

## 【특허청구범위】

### 【청구항 1】

세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 장치로서,

전기 펄스를 생성하는 펄스 발생기;

상기 시료 또는 전해용액을 저장하는 1쌍의 리저버; 및

상기 시료로 내부가 충전되어 있는 관을 포함하며,

상기 1쌍의 리저버는 상기 관에 의하여 서로 연결되고, 상기 1쌍의 리저버에 상기 펄스 발생기의 전극을 삽입하고, 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공하는 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

### 【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 관은 모세관 또는 튜빙인 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

### 【청구항 3】

세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 장치로서,

중공형의 관; 및

상기 관의 후단에 연결되며, 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전할 수 있도록 적정 압력을 유지할 수 있는 압력 유지 수단을 포함하는 것을 특징으로 하는 전

기천공 장치.

#### **【청구항 4】**

제 3 항에 있어서, 상기 관의 후단과 상기 압력 유지 수단은 커넥터에 의하여 연결되며, 상기 커넥터에는 전극을 삽입할 수 있는 전극삽입부가 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

#### **【청구항 5】**

제 4 항에 있어서,

상기 전극삽입부에는 전기 펄스를 인가하기 위한 전극이 삽입되어 있으며,

상기 관의 내부가 시료로 충전되어 있는 경우, 상기 전극은 상기 시료와 접촉하는 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

#### **【청구항 6】**

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 커넥터는 T자형 커넥터 또는 Y자형 커넥터인 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

#### **【청구항 7】**

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 커넥터는 상기 시료를 통과시키기 위한 홀이 내측에 형성되어 있는 디스크 형태이며, 상기 전극삽입부는 디스크 측면에 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

#### **【청구항 8】**

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 관은 모세관 또는 튜빙인 것을 특징으로

로 하는 전기천공 장치.

**【청구항 9】**

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 압력 유지 수단은 펌프, 시린지 또는 피펫인 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

**【청구항 10】**

제 5 항에 있어서,

리저버에 저장되어 있는 시료에 상기 판의 전단이 잠겨있는 상태에서 상기 압력 유지 수단에 의하여 상기 판의 내부가 상기 시료로 충전되어 있고,

상기 리저버에 저장되어 있는 시료와 접촉하고 있는 전극과 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 판 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공하는 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

**【청구항 11】**

세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 시스템으로서,

상기 제 5 항에 따른 전기천공 장치;

전기 펄스를 생성하는 펄스 발생기; 및

상기 시료를 저장하는 리저버를 포함하며,

상기 리저버에는 또다른 전극이 삽입되어 상기 시료와 접촉되어 있고,

상기 리저버에 저장되어 있는 시료에 상기 전기천공 장치의 판의 전단이 잠



겨 있는 상태에서 상기 압력 유지 수단에 의하여 상기 관의 내부가 상기 시료로 충전되어 있으며,

상기 리저버에 저장되어 있는 시료와 접촉하고 있는 전극과 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공하는 것을 특징으로 하는 전기천공 시스템.

#### **【청구항 12】**

제 11 항에 있어서, 상기 전기천공 장치는 복수개 구비되어 있으며, 서로 병렬로 배치되어 있는 것을 특징으로 하는 전기천공 시스템.

#### **【청구항 13】**

세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공 시스템으로서,

상기 제 5 항에 따른 전기천공 장치; 및

전기 펄스를 생성하는 펄스 발생기를 포함하며,

상기 전기천공 장치의 상기 관의 내부는 상기 압력 유지 수단에 의하여 상기 시료로 충전되어 있고, 상기 전기천공 장치의 상기 관의 전단에는 또다른 전극이 삽입되어 상기 시료와 접촉하며,

상기 관의 전단에 삽입되어 있는 전극과 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공하는 것을 특징으로 하는 전기천공 시스템.

#### 【청구항 14】

세포를 포함하는 시료를 리저버에 저장하는 단계(a);

제 5 항에 따른 전기천공 장치에서 상기 관의 전단을 상기 리저버에 저장되어 있는 시료에 담그는 단계(b);

상기 관의 전단이 상기 리저버에 저장되어 있는 시료에 잠겨있는 상태에서 상기 압력 유지 수단을 이용하여 상기 관의 내부를 상기 시료로 충전하는 단계(c);

상기 리저버에 또다른 전극을 삽입하여 상기 시료와 접촉시키는 단계(d);

상기 제 5 항에 따른 전기천공 장치 중 상기 커넥터에 삽입되어 있는 전극과 상기 리저버에 삽입되어 있는 전극 사이에 전기 펄스를 인가함으로써, 상기 관 내에 충전되어 있는 시료 내의 세포를 전기천공하는 단계(e);

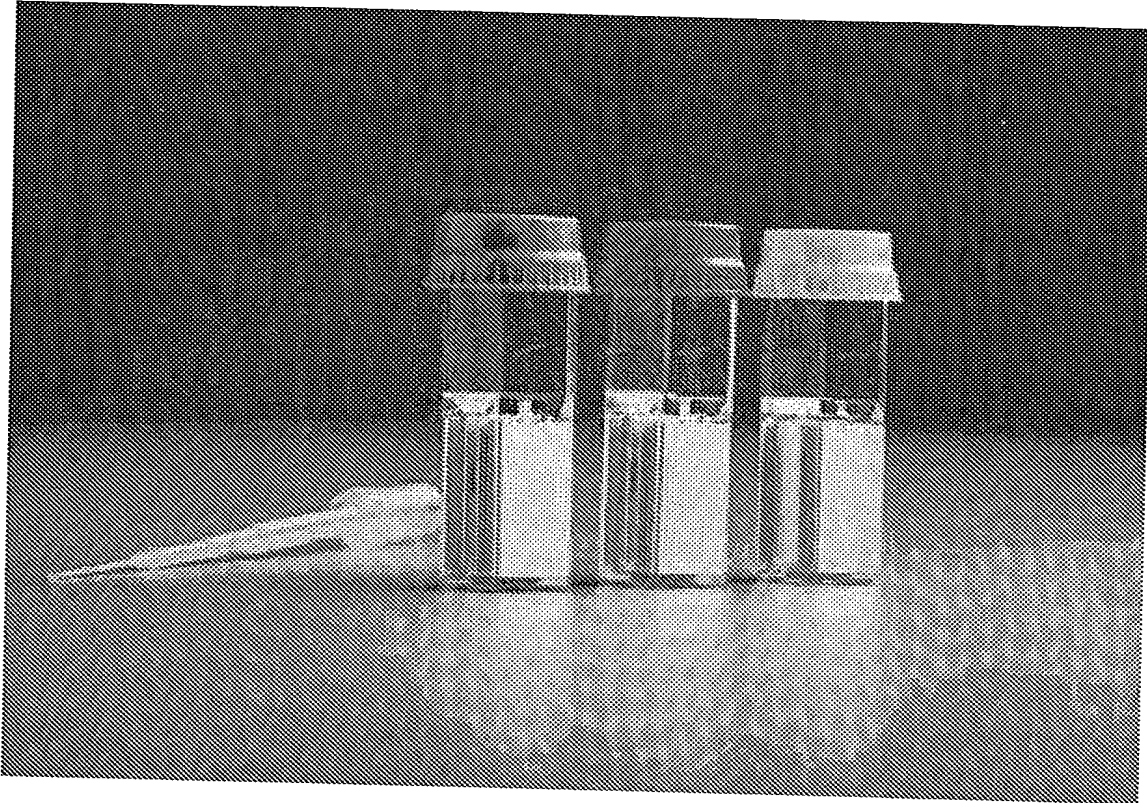
상기 관 내부에 충전되어 있는 시료를 상기 압력 유지 수단을 이용하여 다른 리저버로 이송하여 회수하는 단계(f)를 포함하는 것을 특징으로 하는 전기천공 방법.

#### 【청구항 15】

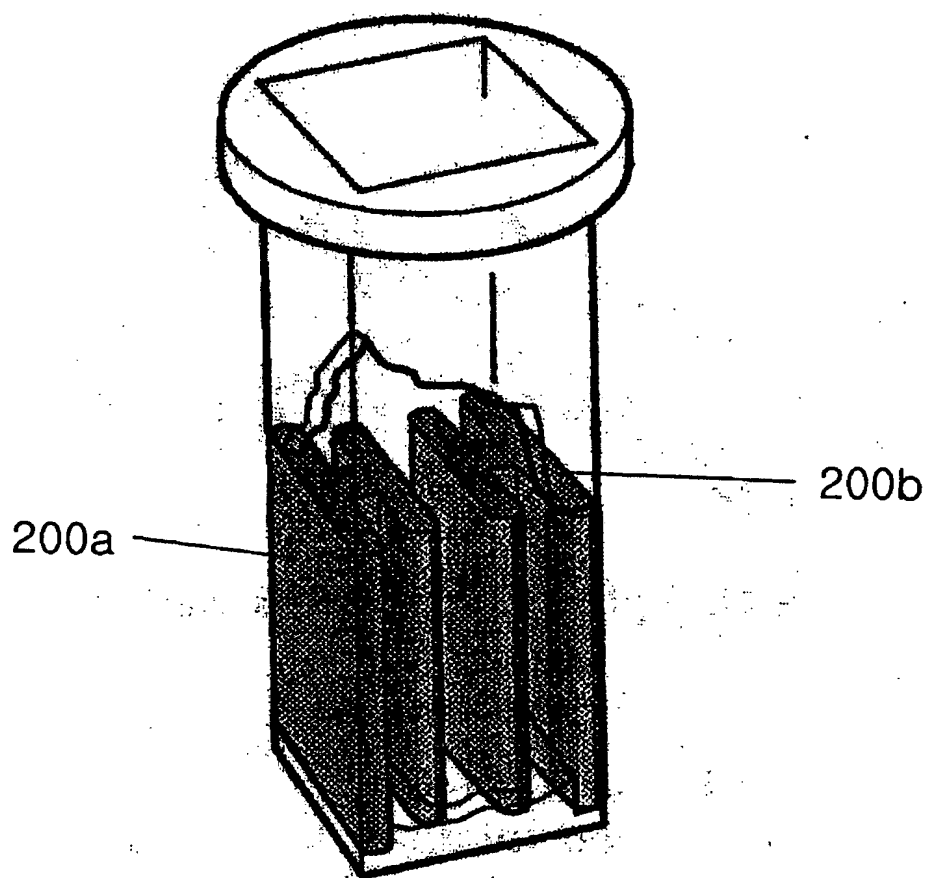
제 14항에 있어서, 상기 리저버에 또다른 전극을 삽입하여 상기 시료와 접촉시키는 단계(d)를 수행하기 전에, 상기 시료가 들어있는 리저버를 전해용액이 들어있는 리저버로 교체하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 전기천공 방법.

【도면】

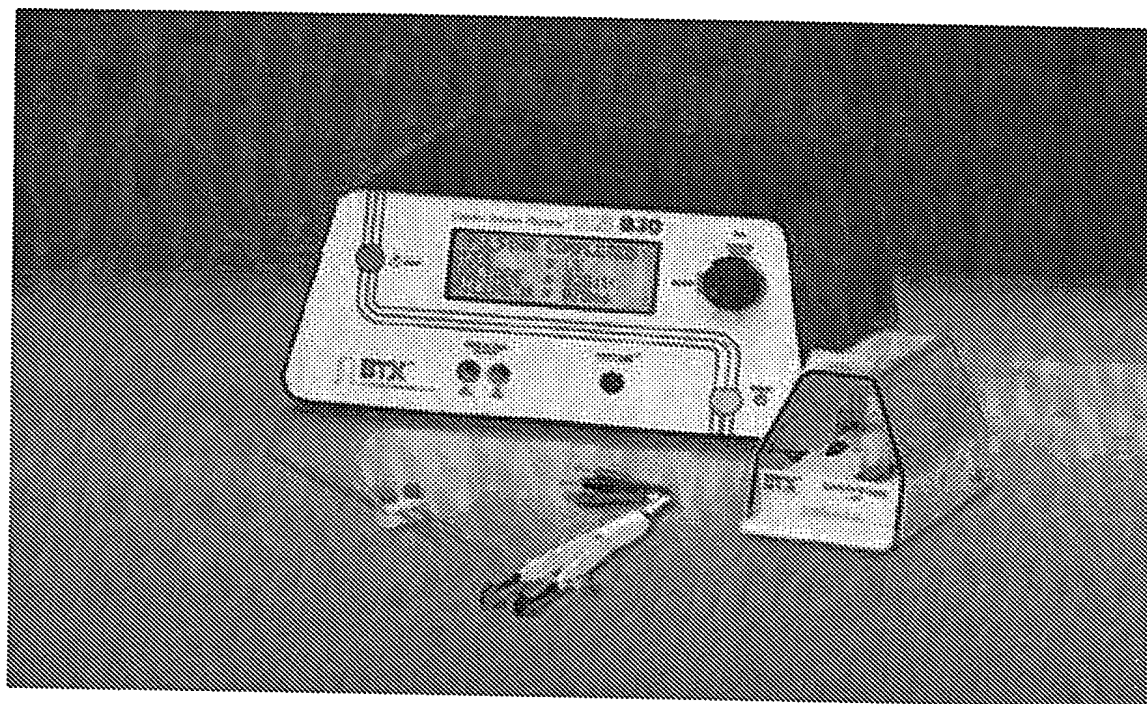
【도 1a】



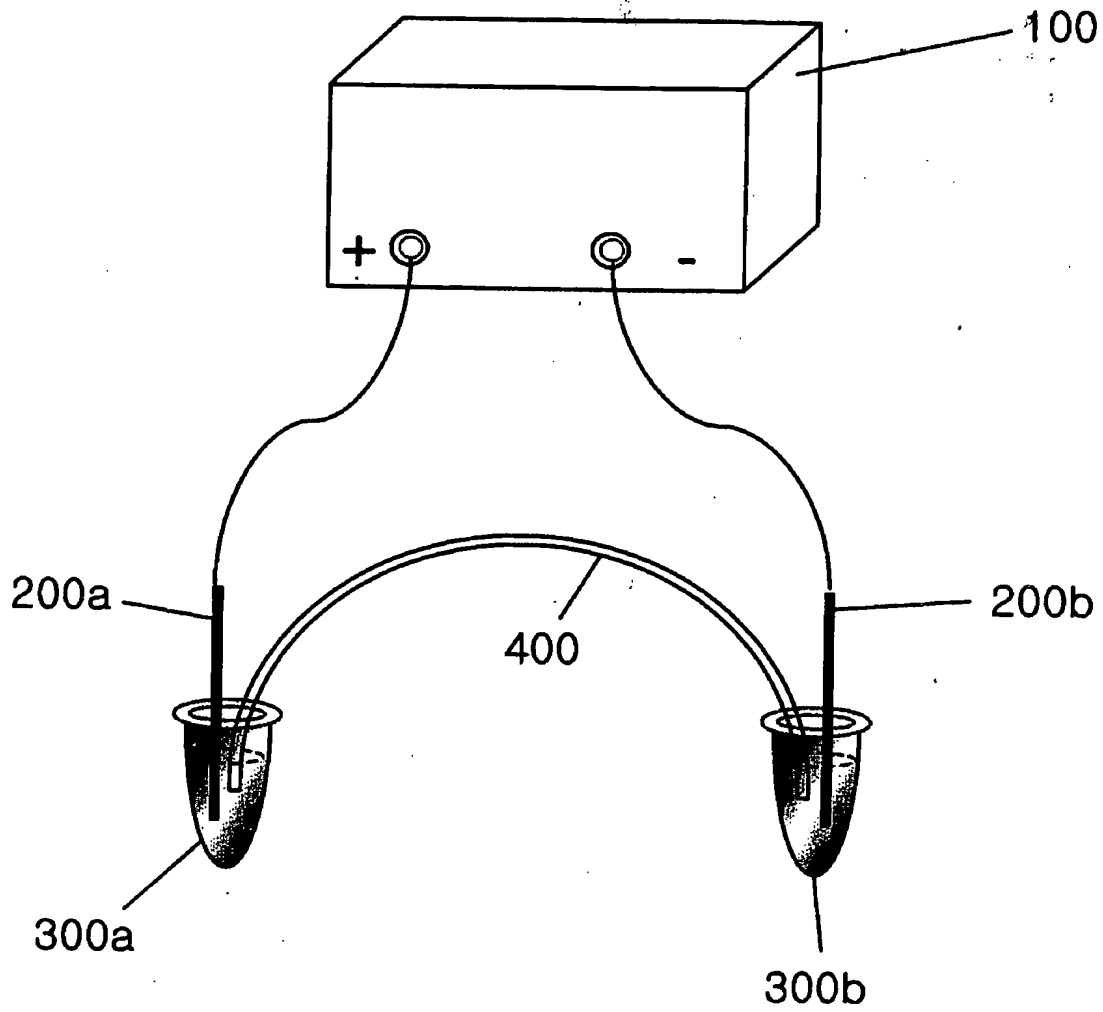
【도 1b】



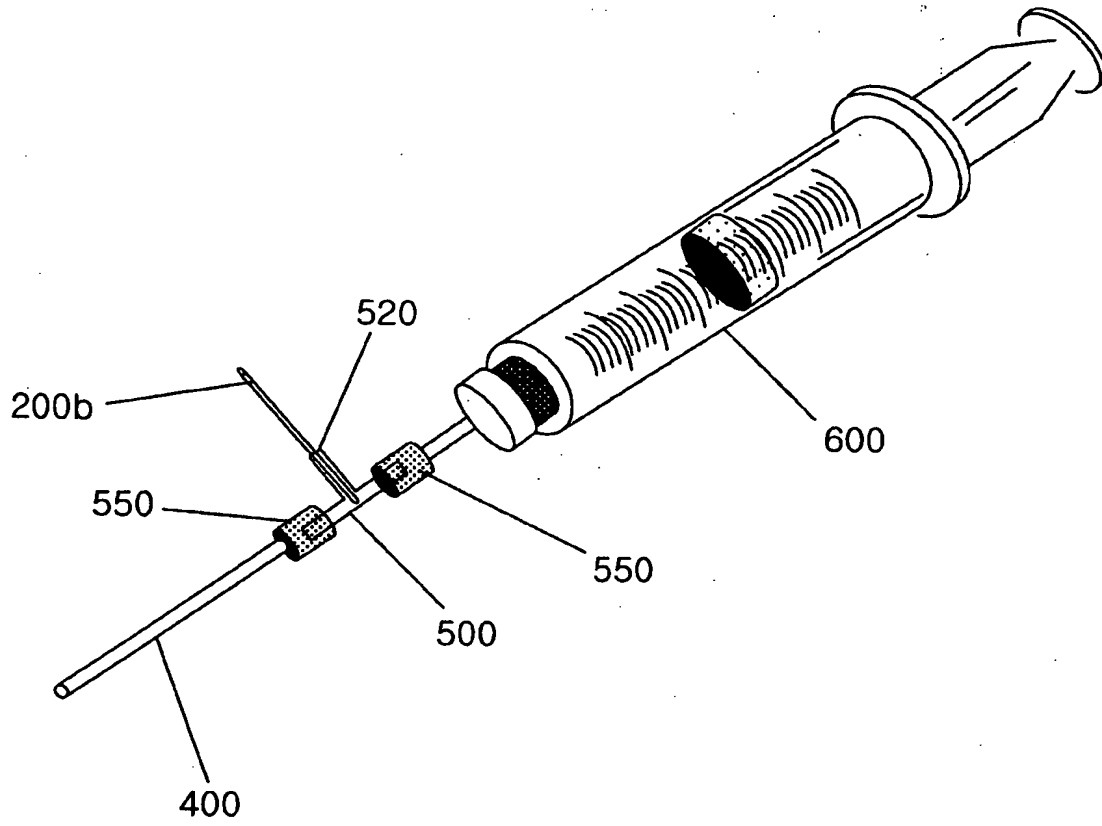
【도 2】



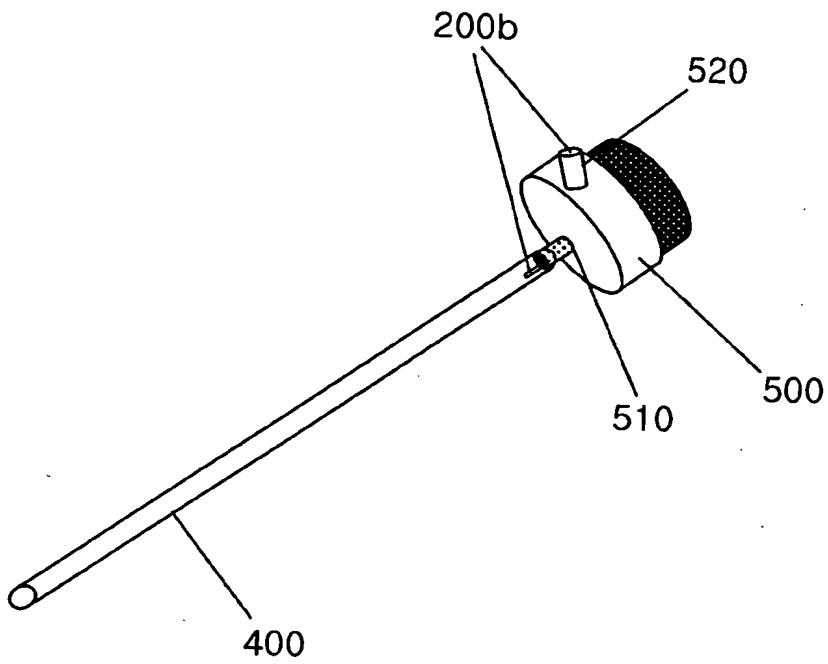
【도 3】



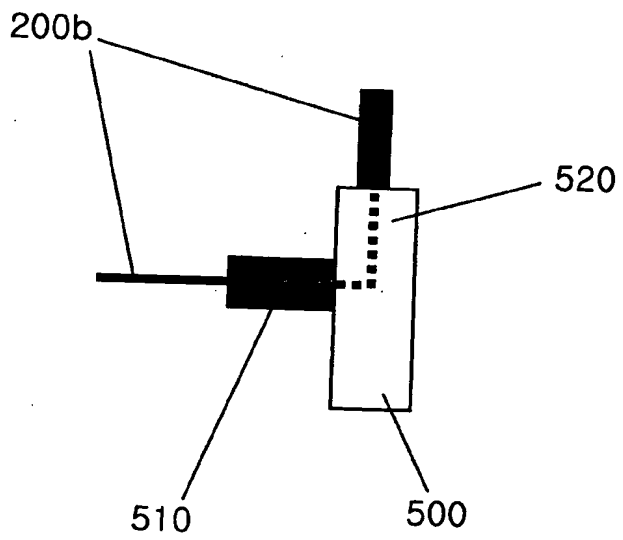
【도 4】



【도 5】

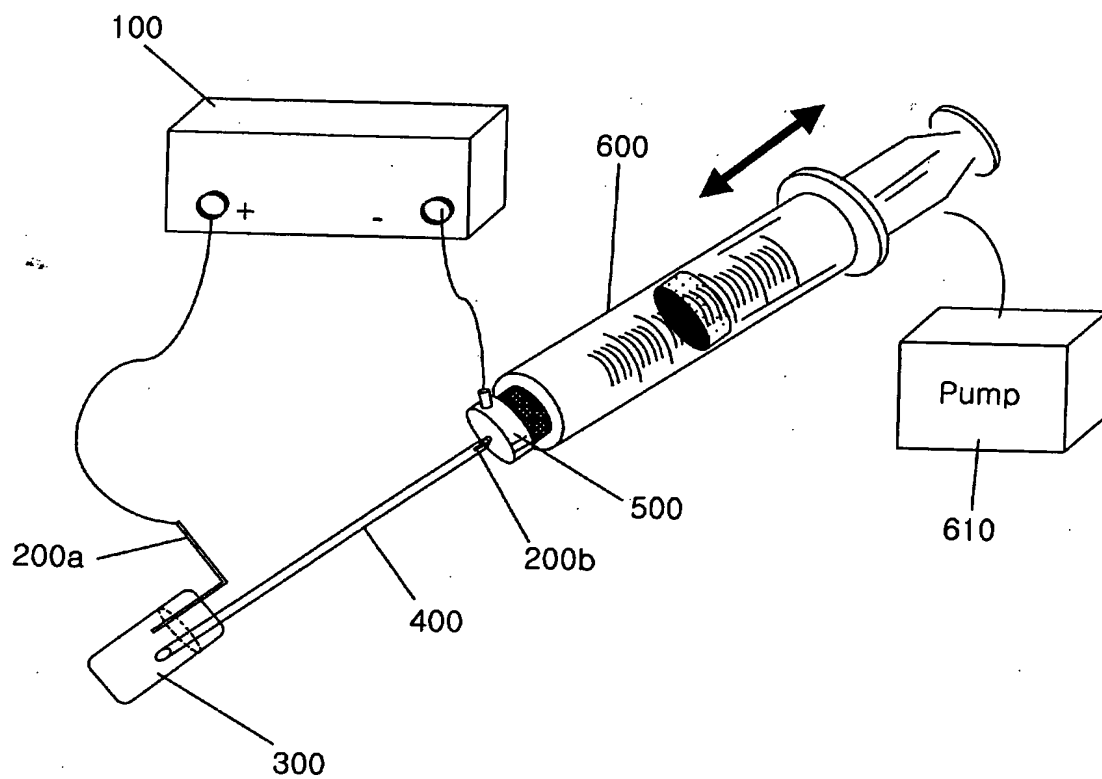


【도 6】

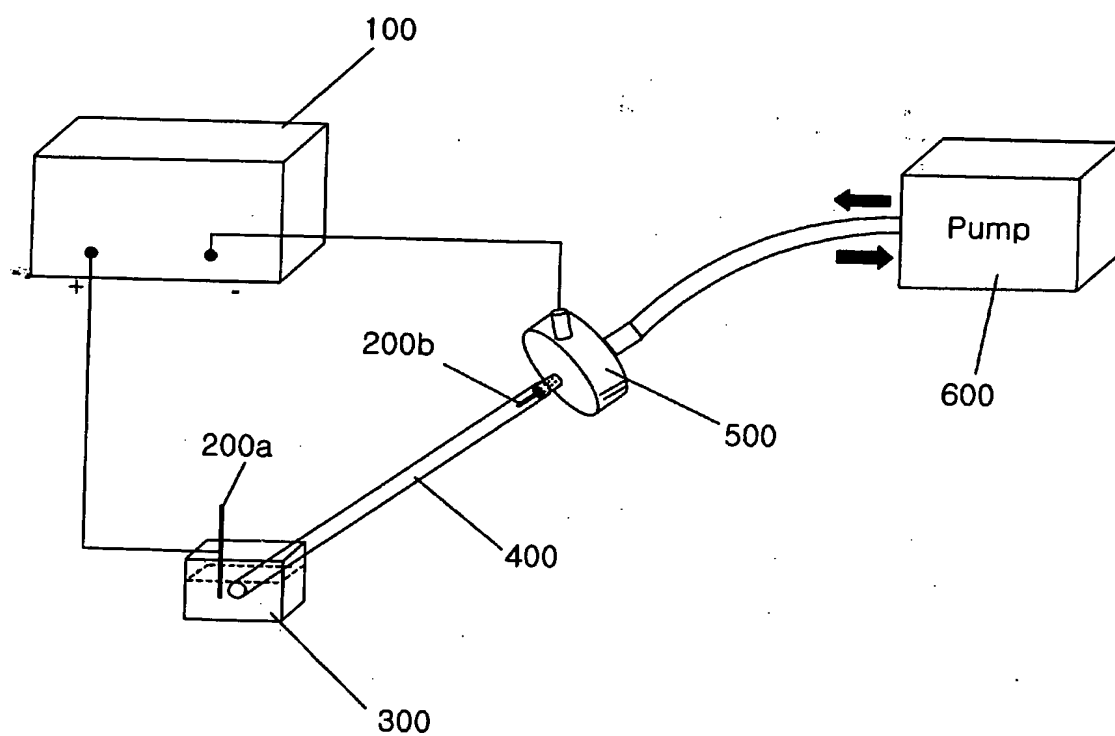




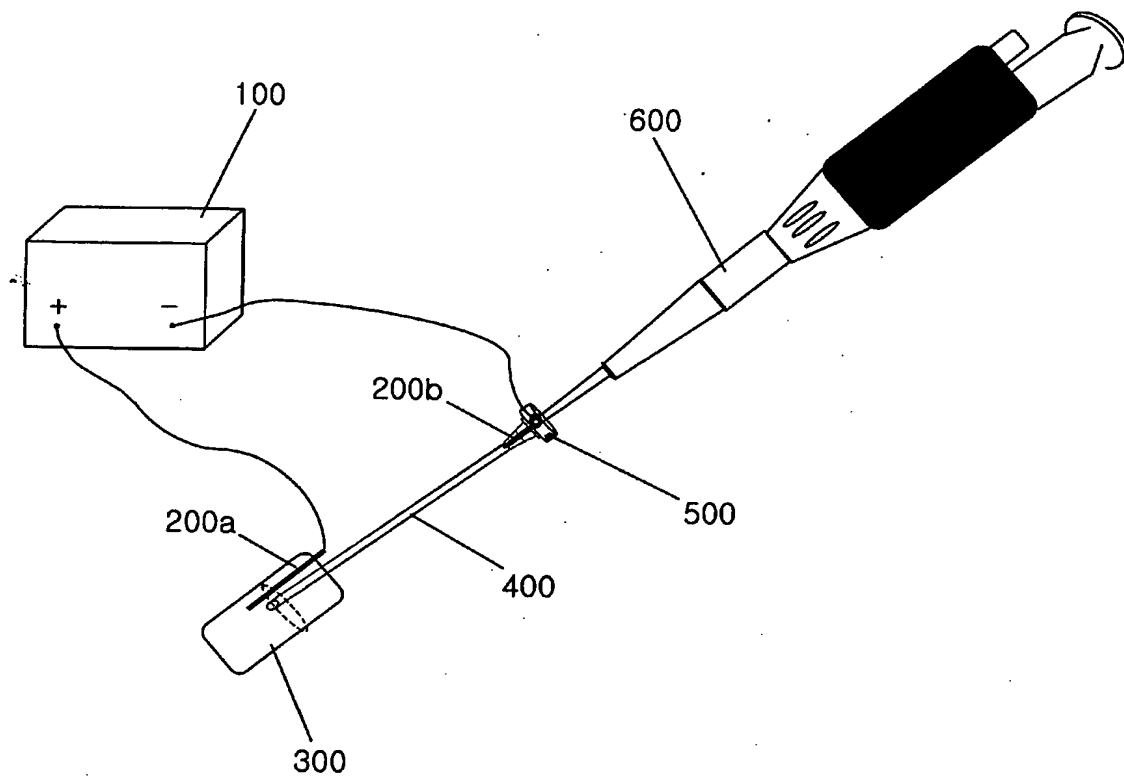
【도 7】



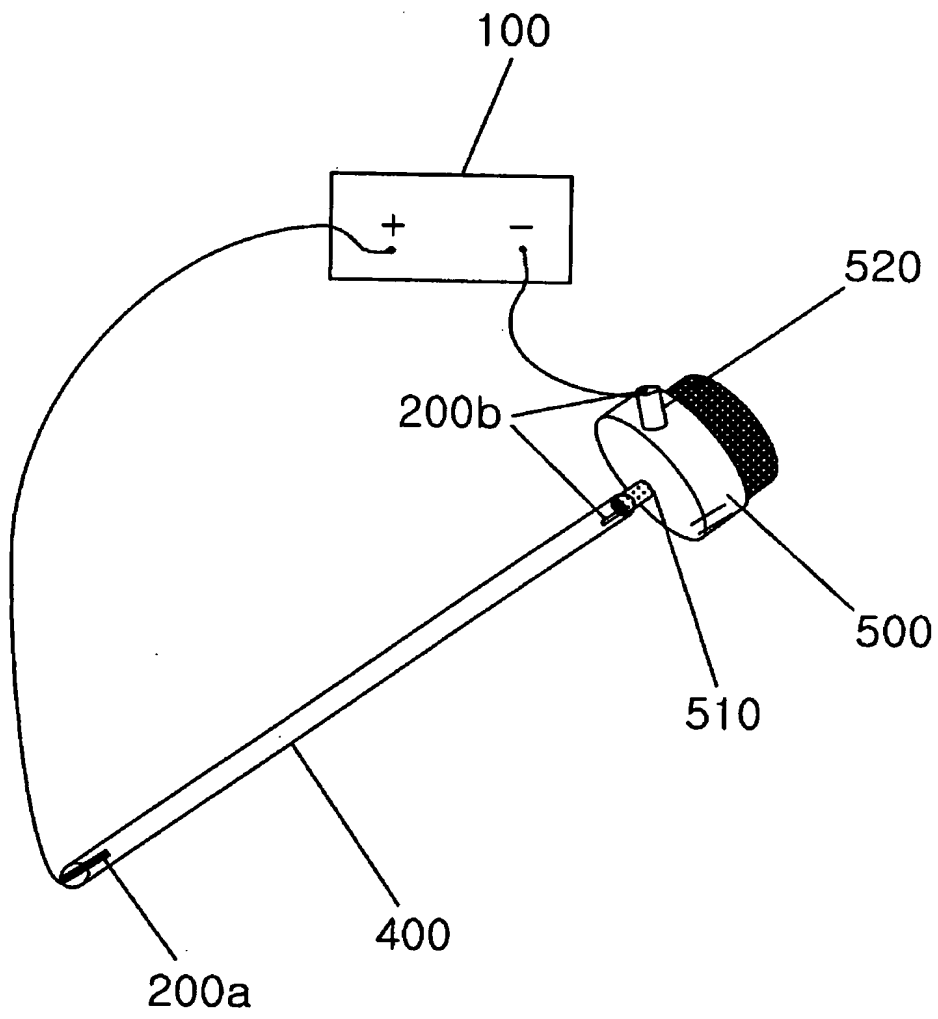
【도 8】



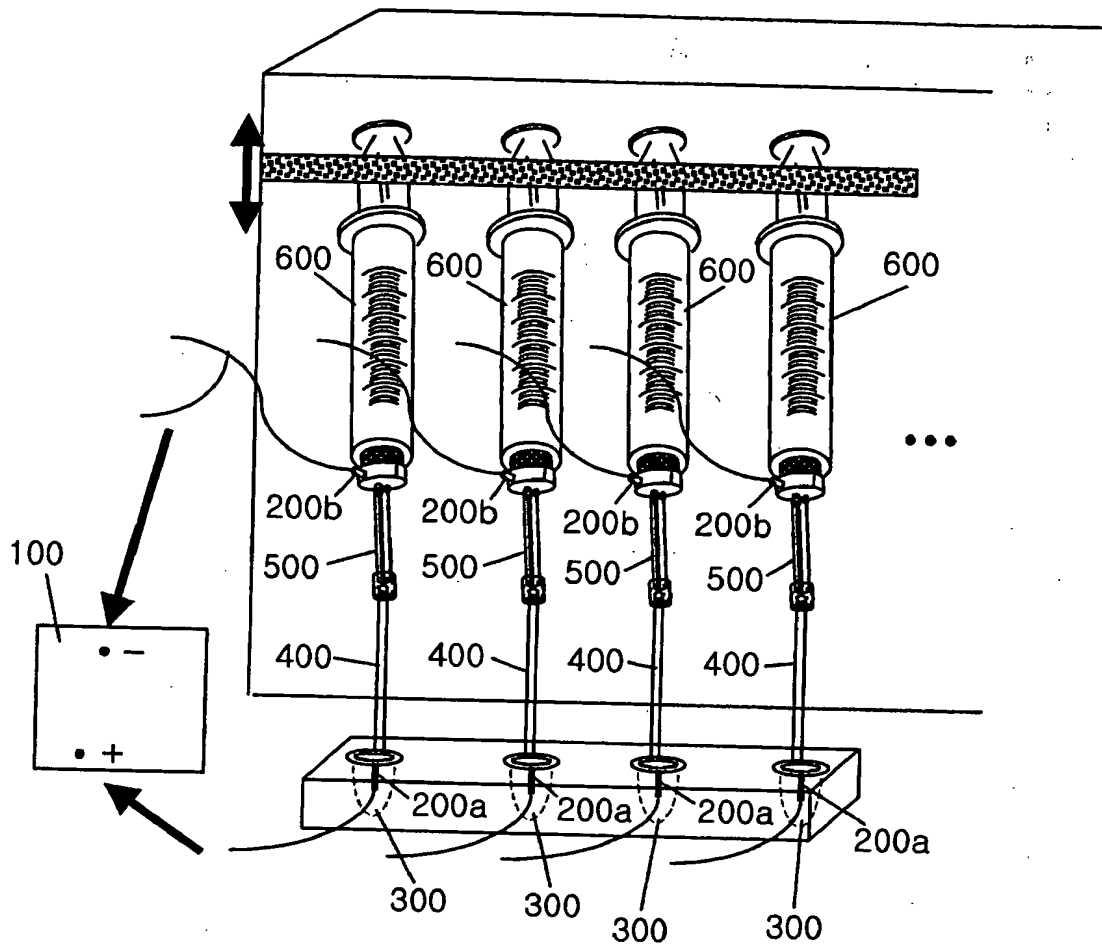
【도 9】



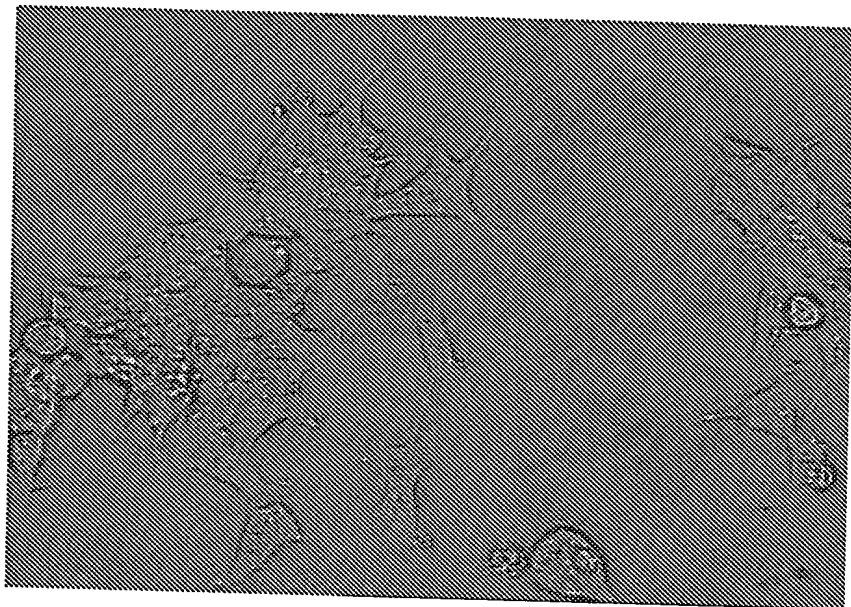
【도 10】



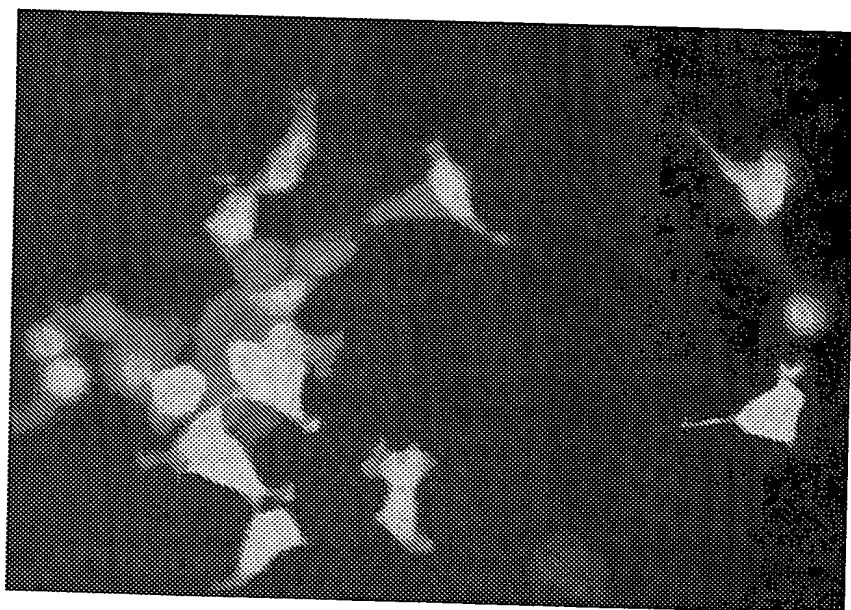
【도 11】



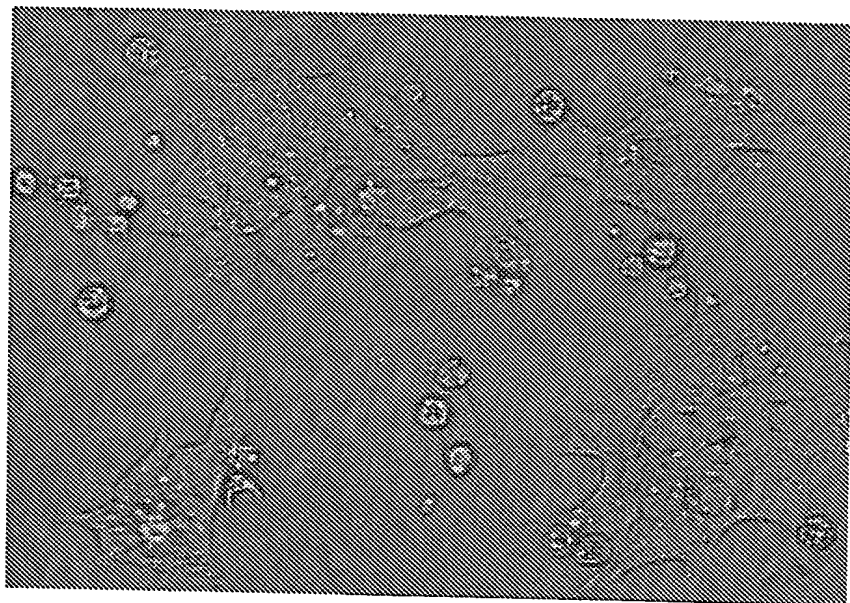
【図 12a】



【図 12b】



【도 13a】



【도 13b】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**